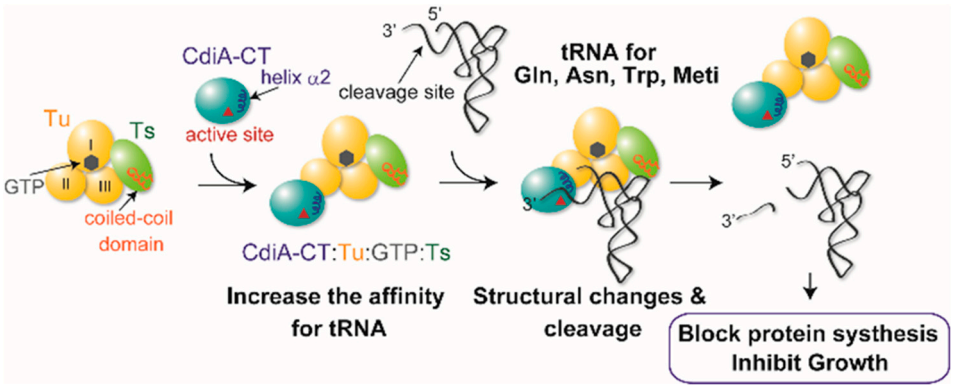
32　病原性細菌の有する接触性増殖阻害蛋白質の制御機構	富田　耕造

【目的】接触性増殖阻害（Contact-dependent growth inhibition：CDI）は腸管出血性大腸菌をはじめ、多くの病原性細菌に広く見いだされ、病原性細菌の優先的かつ爆発的な増殖に関与している。病原性細菌の有する接触性増殖阻害効果は、隣接する非同族細菌内へ接触性増殖阻害蛋白質（CdiA 蛋白質）を挿入し、それによって隣接する細菌の増殖を阻害し、殺傷することによって生じる。最近、腸管出血性大腸菌 NC101 株、EC869 株、肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* 342 株由来の CdiA 蛋白質が、tRNA のアクセプター3' 領域を切断する tRNase 活性を持ち、その活性には翻訳伸長因子 EF-Tu、EF-Ts と GTP が必要であることが報告された。本研究では、これらの病原性細菌由来の CdiA 蛋白質が翻訳伸長因子によって活性化され、特定の tRNA を認識し、切断する分子機構を明らかにすることを目指した。

【方法】腸管出血性大腸菌 EC869 株、NC101 株の CdiA 蛋白質は大腸菌内の翻訳伸長因子 EF-Tu、EF-Ts によって活性化されることがわかっているが、その分子機構も明らかにされていない。今回、翻訳伸長因子である EF-Tu、EF-Ts によって GTP 存在下で活性化され、tRNAAsn のアクセプター領域を切断する腸管出血性大腸菌 EC869 株由来の CdiAEC869 蛋白質が翻訳伸長因子によって活性化される分子機構を、生化学的、遺伝学的、構造生物学的手法を用いて解析した。

【結果】一連の生化学解析、X 線結晶構造解析を通して、翻訳伸長因子 Tu、Ts によって GTP 存在下で促進される CdiA 蛋白質による tRNA 切断反応は、CdiA:Tu:GTP:Ts:tRNA（あるいはアミノアシル tRNA: aa-tRNA）複合体を介して進行することが明らかになった。まず、隣接する大腸菌から送り込まれた CdiA 蛋白質は、Tu:GTP:Ts 三者複合体中の Tu のドメインⅡにリクルートされ、CdiA:Tu:GTP:Ts 四者複合体を形成する。次に、基質であるアミノアシル-tRNA（または tRNA）が CdiA:Tu:GTP:Ts によって認識され、CdiA:Tu:GTP:Ts:aa-tRNA（または tRNA）5 者複合体が形成される。この複合体中の Ts は tRNA 分子の複合体への親和性を高めるとともに、tRNA の 3'末端領域および CdiA の構造変化を誘発し、結果として CdiA による tRNA 切断触媒反応を促進する。CdiA による tRNA の切断により、蛋白質合成は阻害され、最終的に細菌の増殖が抑制される。したがって、Tu:Ts 複合体は接触性増殖阻害プロセスにおいて、CdiA による tRNA の切断を促進する「反応の足場（Reaction Scaffold）」として働き、翻訳伸長因子が蛋白質合成過程での役割とは別のこれまで知られていなかった新たな機能を有していることが明らかになった。

翻訳伸長因子による接触性増殖阻害蛋白質の活性化機構



32. 病原性細菌の有する接触性増殖阻害蛋白質の制御機構

富田　耕造

東京大学 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻

Key words：病原菌細菌，接触性増殖阻害，tRNA 切断，翻訳伸長因子

緒　言

接触性増殖阻害（Contact-dependent growth inhibition：CDI）は腸管出血性大腸菌をはじめ、多くの病原性細菌に広く見いだされ、病原性細菌の優先的かつ爆発的な増殖に関与している［1］。病原性細菌の有する接触性増殖阻害効果は、隣接する非同族細菌内へ接触性増殖阻害蛋白質（CdiA 蛋白質）を挿入し、それによって隣接する細菌の増殖を阻害し、殺傷することによって生じる。これは、病原性細菌のみが優先的に増殖する細菌の「生存競争」システムのひとつであると考えられている。

多くの病原性細菌に見出される接触性増殖阻害機能は、病原性細菌が他の細菌の増殖を抑え、自身のみ爆発的に増殖し、結果、病原性細菌による感染症が急速に蔓延するといった社会的問題が生じている。

大腸菌では CDI を司る遺伝子は、*cdiA*、*cdiB*、*cdiI* からなる。CdiA は、N 末端が細胞表面から突出したフィラメント状構造をとり、受容体結合ドメイン（RBD）と C 末端側の毒素ドメイン（CdiA-CT）からなる。CdiB は外膜蛋白質であり、CdiA は CdiB を介して細胞外へ輸送される。CdiA の RBD が隣接する細菌の受容体に結合すると、CdiA は自己蛋白質分解活性により CdiA-CT を切りはなし、CdiA-CT は標的細胞内に移行する。CdiI は、CdiA-CT:CdiI 複合体を形成することで、細胞を自己毒から守る免疫蛋白質である。従って、対応する CdiI を持たない非同種の細菌の増殖は、CdiA-CT によって阻害されることになる。

最近、腸管出血性大腸菌 NC101 株、EC869 株、肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* 342 株由来の CdiA が、tRNA のアクセプター3' 領域を切断する tRNase 活性を持ち、その活性には翻訳伸長因子 EF-Tu、EF-Ts と GTP が必要であることが報告された［2］。本研究課題では翻訳伸長因子によって活性化される腸管出血性大腸菌 EC869 由来の CdiA トキシン（以下 CdiA-CT と簡略化して略す）に注目した。CdiA-CT は tRNase 活性を持ち、$tRNA^{Gln}$ と $tRNA^{Asn}$ のアクセプター部位 3'側の 71 と 72 の間を特異的に切断するとともに、その活性には翻訳伸長因子 EF-Tu と EF-Ts、そして GTP によって活性化されると報告された。また、EF-Ts の coiled-coil（コイルドコイル）ドメインの *tsf* 変異体は、CdiA-CT による生育阻害に抵抗性を示すことも報告された［2］。しかし、これらの CdiA-CT の基質 tRNA の選択的認識機構や翻訳伸長因子 EF-Tu および EF-Ts の CdiA-CT の活性化機構は明らかになっていなかった。

本研究では、これらの病原性細菌由来の CdiA 蛋白質が翻訳伸長因子によって活性化され、特定の tRNA を認識し、切断する分子機構を明らかにすることを目指した。病原性細菌の優先的増殖に関与する CdiA 蛋白質の詳細な分子機構の解明は、それらの蛋白質活性を阻害することにより、病原性の爆発的増殖、感染症の蔓延を予防する新たな薬剤の開発への技術的基盤を提供し、疾病の予防や治療、健康の増進に寄与することが期待される。

方　法

1. 蛋白質の精製、構造解析、機能解析

腸管出血性大腸菌 EC869 株、EC536 株、NC101 株、EC3006 株において見出された接触性増殖阻害蛋白質（CdiA 蛋白質）に注目した。これらの CdiA が標的とする tRNA 種は病原性大腸菌ごとに異なり、それらの基質認識・識別機構の詳細は明らかにされていない。また、腸管出血性大腸菌 EC869 株、NC101 株の CdiA 蛋白質は大腸菌内の翻訳伸

長因子 EF-Tu、EF-Ts によって活性化されることが報告されたが、その分子機構も明らかにされていない。今回、翻訳伸長因子である EF-Tu、EF-Ts によって GTP 存在下で活性化され、グルタミンあるいはアスパラギンを受容する tRNAGln あるいは tRNAAsn のアクセプター領域の 71 と 72 番目の間を切断する腸管出血性大腸菌 EC869 株由来の CdiAEC869 蛋白質が翻訳伸長因子によって活性化される分子機構を、生化学的、遺伝学的、構造生物学的手法を用いて解析した。

結　果

1. CdiAEC869 による tRNA の切断解析

まず、CdiAEC869 の標的となる細菌内の tRNA を解析した。CdiAEC869 を大腸菌内で発現誘導し、その後、直ちに大腸菌からアミノアシル tRNA を酸性条件下で分離し、得られたアミノアシル tRNA を質量分析によって解析した。その結果、CdiAEC869 によって切断されると報告されていた tRNAAsn および tRNAGln に加えて、tRNATrp と tRNAfMet が減少していることが明らかになった。さらに CdiAEC869 を発現誘導した大腸菌の tRNA 画分を Northern Blotting で解析したところ、確かにこれらの 4 種類の tRNA が切断されていることが確認できた。また、翻訳伸長因子 Tu、Ts、GTP 存在下で CdiAEC869 による tRNAAsn の変異体を用いた切断活性解析から CdiAEC869 は tRNA の識別塩基（73 位）およびアクセプター領域の上部の塩基対（1-72）を認識して tRNA を切断していることが明らかになった。

2. CdiAEC869 による tRNA 切断におけるアミノアシル化の効果

アミノアシル tRNA（aa-tRNA）と Tu:GTP の間の親和性はアミノ酸を受容していない tRNA と Tu:GTP の間の親和力よりもはるかに強いため、Tu、Ts、GTP の存在下で、aa-tRNA が CdiAEC869 によってアミノ酸を受容していない tRNA よりも効率的に切断されるかを検討した。しかし、tRNA のアミノアシル化は翻訳伸長因子 Tu、Ts、GTP 存在下での CdiAEC869 による tRNA の切断効率を増加させなかった（図 1A 左）。また、aa-tRNA の Tu への結合を低下させる H66A 変異を持つ Tu（加えて Ts と GTP）存在下でも、CdiA による tRNA 切断効率には影響を与えなかった（図 1A 右）。よって、tRNA のアミノアシル部分は tRNA の切断に必要ではないことが明らかになった。

3. Tu および Ts 内の CdiAEC869 による tRNA 切断活性化に関与するアミノ酸残基

Tu 分子内のどのアミノ酸残基が CdiAEC869 による tRNA の切断促進に関与しているか解析した。Tu:GTP:aa-tRNA の 3 者複合体中で tRNA と相互作用する Tu のアミノ酸残基を変異させると CdiAEC869 による tRNA 切断効率が減少した（図 1B）。Ts に関しては Ts のコイルドコイルドメインが CdiAEC869 による tRNA 切断の活性化に必須であることが報告されていたが［2］、コイルドコイルドメイン内の塩基性残基に変異を導入すると tRNA の切断効率を低下させることが示された（図 1C）。これらの結果は tRNA の CdiAEC869 による切断が Tu 分子内の tRNA に結合するアミノ酸残基と Ts のコイルドコイルドメインに依存していることを示しており、Tu と Ts の両方が CdiAEC869 による tRNA 切断反応中に tRNA と相互作用し、Tu : GTP : Ts 複合体が tRNA の切断過程に関与していることが示唆された。そこで、Tu と Ts を融合させ、Tu:GTP:Ts 複合体を模倣した一本鎖にした Tu-Ts 蛋白質（sg-Tu-Ts）を用いて CdiAEC869 による tRNA 切断の活性化を解析したところ（図 1D）、Tu と Ts が別々に存在する場合と同程度に切断効率が増加した。一方、コイルドコイルドメインを欠失させた sg-Tu-Ts_ΔCC は CdiAEC869 による tRNA の切断を促進しなかった（図 1E）。よって、この tRNA 切断の促進は Ts のコイルドコイルドメインに寄与していることも示唆された。

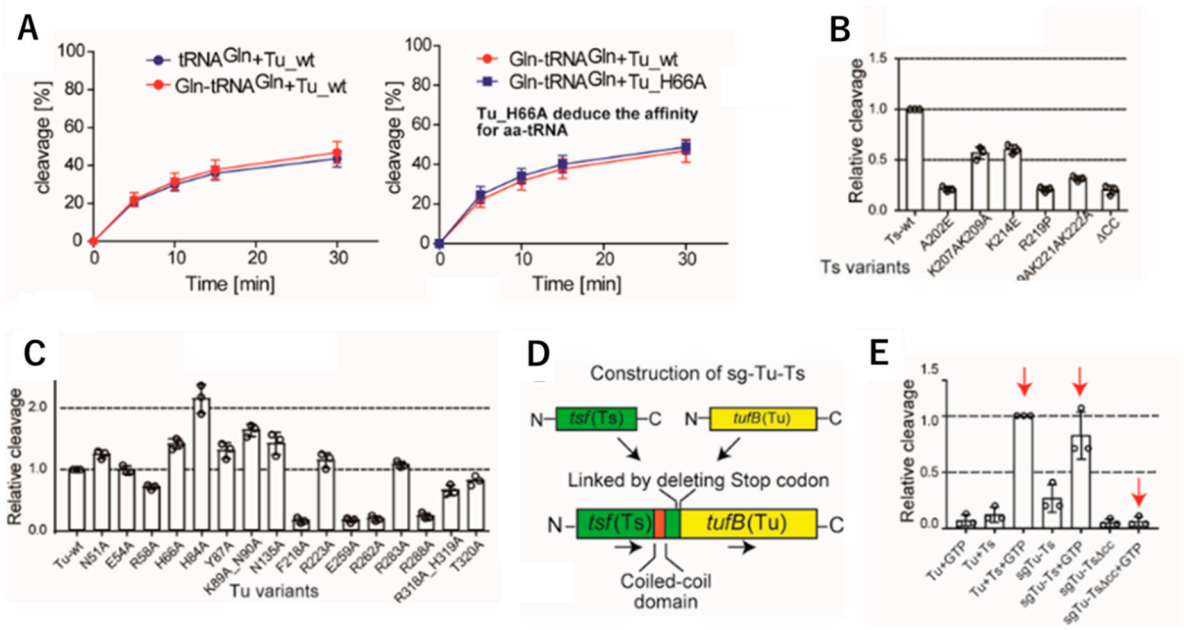


図 1. CdiA 蛋白質による tRNA 切断反応における翻訳伸長因子の効果

A) tRNA のアミノアシル化状態は翻訳伸長因子 Tu、Ts の存在下での CidA による tRNA 切断効率に影響を与えない。EF-Tu の H66A 変異体も CdiA による tRNA 切断効率に影響を与えない。

B) EF-Ts のコイルドコイルドメイン中の塩基性アミノ酸の変異による CdiA による tRNA 切断活性化の影響。

C) EF-Tu の tRNA 結合に関わるアミノ酸変異による CdiA による tRNA 切断活性化の影響。

D) Tu と Ts の融合蛋白質 sgTu-Ts。

E) sgTu-Ts による CdiA による tRNA 切断活性化。sgTu-TsΔCC は tRNA 切断を活性化しない。

4. GTP 存在下で CdiAEC869:Tu:Ts:aa-tRNA（tRNA）複合体形成

CdiAEC869 による tRNA の切断活性化に Tu と Ts の両方が必要であることから、CdiA:Tu（GTP）:Ts:tRNA 複合体が形成されるか否か pull-down アッセイによって検討した。aa-tRNA と Tu:GTP の親和性は tRNA と Tu:GTP との親和性よりもはるかに高く、実際、pull-down アッセイにおいて、GTP 存在下では aa-tRNA のみが Tu と pull-down された。この条件下で、CdiAEC869 単独では tRNA や aa-tRNA を pull-down せず、また、CdiAEC869 は Tu と GTP の存在下で aa-tRNA（tRNA）は pull-down せず、Tu のみを pull-down した。これは CdiAEC869 が Tu と直接相互作用し、同時に CdiAEC869 が Tu と aa-tRNA の結合を妨げ、CdiA : Tu : GTP : aa-tRNA（tRNA）のような複合体は形成されないことを示唆している。一方、Tu、GTP に加え、Ts を補うと tRNA も aa-tRNA も Tu と Ts とともに CdiAEC869 によって pull-down された。これらのことから GTP 存在下で CdiAEC869:Tu:Ts:aa-tRNA（tRNA）複合体が形成されることが明らかになった（図 2）。

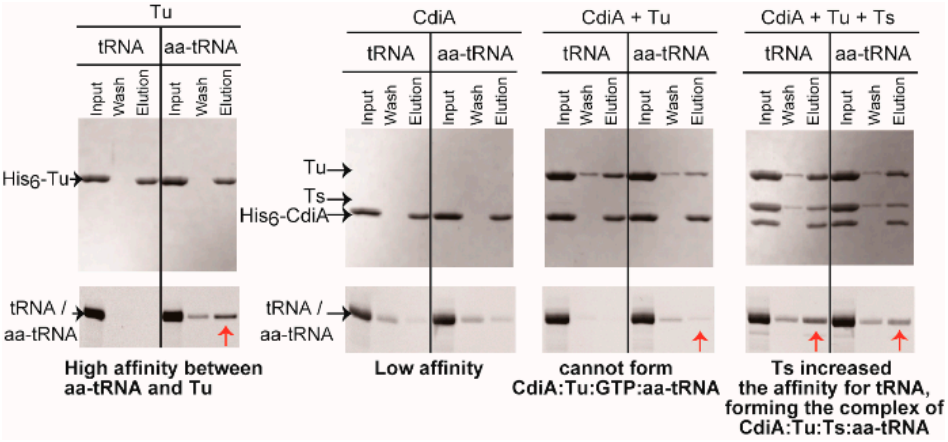


図 2. CdiA: EF-Tu（GTP）:EF-Ts:tRNA からなる 4 者複合体の形成
CdiA は Tu に直接結合し、Ts の共存在下では CdiA:Tu（GTP）:Ts:aa-tRNA（tRNA）の複合体を形成する。

5. CdiAEC869:CdiI:Tu の X 線結晶構造決定

CdiAEC869 と Tu の相互作用の詳細な分子基盤を探るために、CdiA:CdiI:Tu 複合体の X 線結晶構造を決定した。この構造から、CdiAEC869 は Tu のドメインⅡと相互作用することが明らかになった。Tu のドメインⅡは Tu:GTP:aa-tRNA の 3 者複合体において aa-tRNA の 3' 領域と相互作用する部位であることが知られている（図 3A）。このことは CdiAEC869 が存在する場合、aa-tRNA が Tu と pull-down されない結果と一致する（図 2）。Tu:GTP:aa-tRNA 構造と CdiAEC869 : Tu 複合体構造を重ね合わせたモデルでは aa-tRNA の 3'末端が CdiAEC869 と立体的に衝突することが示された（図 3A）。したがって、CdiAEC869 が tRNA の 3'-アクセプター領域部分を切断するには aa-tRNA の 3' 末端が構造変化を起こす必要があることが示唆された（図 3B）。CdiAEC869 蛋白質の表面電荷分布解析から、正電荷を持つアミノ酸残基は CdiAEC869 と Tu との接触面とは反対側に集まっており、おそらく tRNA の 3'-領域はその正電荷領域に結合すると予想される。実際、その領域の活性残基とされる His216、His281、Arg271 への変異を導入すると、CdiAEC869 による大腸菌の増殖抑制活性が低下することが明らかになった。

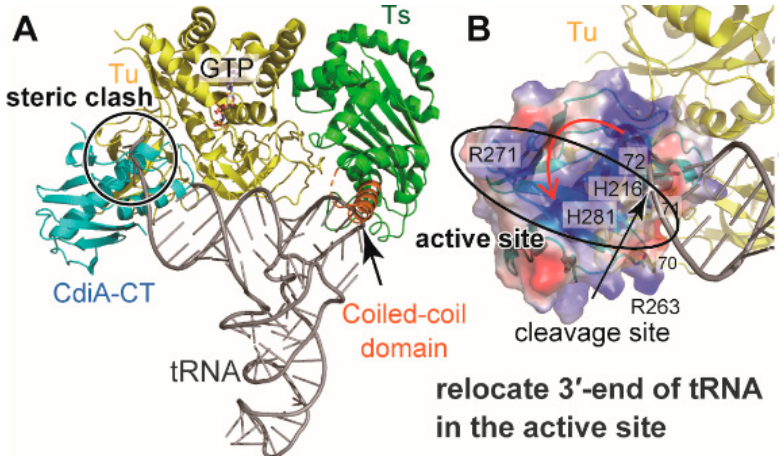


図 3. CdiA: EF-Tu（GTP）:EF-Ts:tRNA からなる 4 者複合体モデル
A) CdiA:Tu（GTP）:Ts:aa-tRNA（tRNA）の複合体モデル。
B) アミノアシル tRNA の 3'領域はコンフォーメーションをかえ、CdiA の Tu と接していない正電荷（青色）を帯びた活性部位へ移動し、CdiA によって切断される。

考　察

以上の結果から、翻訳伸長因子 Tu、Ts によって GTP 存在下で促進される CdiA による tRNA 切断反応は CdiA:Tu:GTP:Ts:tRNA（aa-tRNA）複合体を介して進行するというモデルを提唱する（図 4）。まず、細胞内に送り込まれた CdiA は、Tu:GTP:Ts 三者複合体中の Tu のドメインⅡにリクルートされ、CdiA:Tu:GTP:Ts の 4 者複合体を形成する。次に、基質である aa-tRNA（または tRNA）が CdiA:Tu:GTP:Ts によって認識され CdiA:Tu:GTP:Ts:aa-tRNA（tRNA）5 者複合体が形成される。この複合体中の Ts は tRNA 分子の複合体への親和性を高めるとともに tRNA の 3'末端領域および CdiA の構造変化を誘発し、結果として CdiA による tRNA 切断触媒反応を促進する機能がある。基質となる tRNA は切断されるため、蛋白質合成は阻害され、最終的に細菌の増殖が抑制される。したがって、Tu:Ts 複合体は接触性増殖阻害プロセスにおいて、CdiA による tRNA の切断を促進する「反応の足場（Reaction Scaffold）」として働くことが強く示唆された［3］。

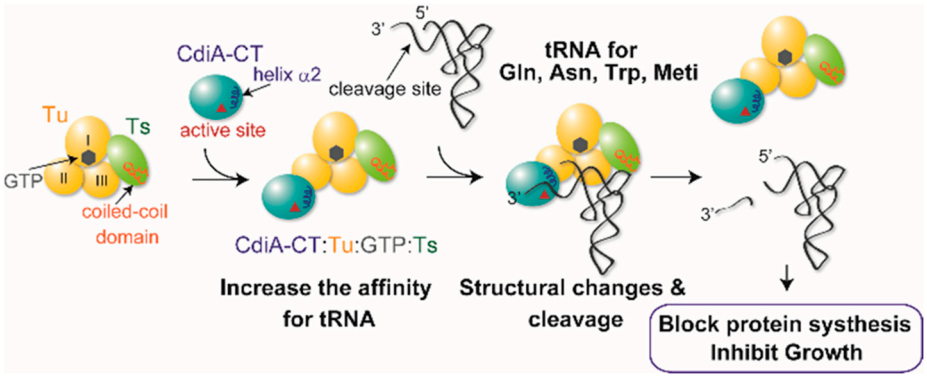


図 4.　翻訳伸長因子による CdiA による tRNA 切断活性化のモデル
CdiA による tRNA 切断が GTP 存在下で翻訳伸長因子 EF-Tu、EF-Ts によって活性化される分子機構モデル。CdiA が Tu（GTP）:Ts と相互作用し、CdiA:Tu（GTP）:Ts 複合体を形成する。この複合体が aa-tRNA（tRNA）と結合し、tRNA の 3'の領域の構造を変化させ、tRNA が効率よく切断される。Tu（GTP）:Ts は tRNA 切断の「reaction scaffold 反応場」として機能する。

共同研究者・謝辞

本研究における X 線構造解析は、高エネルギー加速器研究機構のビームラインを用いて行われた。

文　献

1)　Aoki, S.K., Diner, E.J., de Roodenbeke, C.T., Burgess, B.R., Poole, S.J., Braaten, B.A., Jones, A.M., Webb, J.S., Hayes, C.S., Cotter, P.A. and Low, D.A.　A widespread family of polymorphic contact-dependent toxin delivery systems in bacteria. (2010) Nature 468(7322): 439-442, 21085179, DOI: 10.1038/nature09490

2)　Jones, A.M., Garza-Sánchez, F., So, J., Hayes, C.S. and Low, D.A. Activation of contact-dependent antibacterial tRNase toxins by translation elongation factors. Proceedings of the National Academy of Sciences 2017 114(10):1951-1957, 28223500, DOI: 10.1073/pnas.1619273114

3)　Wang, J., Yashiro, Y., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., and Tomita, K. Mechanistic insights into tRNA cleavage by a contact-dependent growth inhibitor protein and translation factors, Nucleic Acids Research, 2022, 50 (8):4713–4731, 35411396, DOI: 10.1093/nar/gkac228